

EP 64452

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003549814

WPI Acc No: 1982-97811E/*198246*

Related WPI Acc No: 1980-36799C; 1981-29440D; 1981-75714D; 1985-305015

**Antithrombotic hexasaccharide compsn. with high Yin-Nessler activity -
having reduced haemorrhage risk, are prepd. by degradation of
octasaccharide(s) with heparinase, pref. from Flavobacterium**

Patent Assignee: CHOAY SA (LCHO)

Inventor: CHOAY J; LORMEAU J C; PETITOU M

Number of Countries: 015 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 64452	A	19821110	EP 82400739	A	19820426	198246 B
FR 2504928	A	19821105				198250
JP 57190001	A	19821122				198301
DK 8201899	A	19830314				198317
CA 1180292	A	19850102				198506
EP 64452	B	19850417				198516
DE 3263083	G	19850523				198522
US 4826827	A	19890502	US 7991164	A	19791105	198920
			US 80194544	A	19801006	
			US 80204505	A	19801106	
			US 82373016	A	19820429	
			US 86851892	A	19860321	

Priority Applications (No Type Date): FR 818604 A 19810429; FR 7831357 A
19781106; FR 7918873 A 19790720; GB 7934673 A 19791005; GB 80443 A
19800107; GB 8021749 A 19800702; GB 8021750 A 19800702; GB 8029697 A
19800915

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; EP 27089

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 64452	A	F	34		
					Designated States (Regional): AT BE CH DE GB IT LI LU NL SE
EP 64452	B	F			
					Designated States (Regional): AT BE CH DE GB IT LI LU NL SE
US 4826827	A				Cont of application US 7991164 CIP of application US 80194544 CIP of application US 80204505 Cont of application US 82373016

Abstract (Basic): EP 64452 A

Short-chain oligosaccharide compsns. comprise hexasaccharides of
formula (I) and their salts (where R is H or SO₃⁻) one or two gps.
pref. being -SO₃⁻).

(I) are antithrombotics which have reduced haemorrhage risk. (I)
inhibit activated factor X, i.e. Xa, specifically and only have very
weak activity on the total blood coagulation. (I) have a Yin-Nessler
(Y-W) titration (Xa activity) of above 2000u/mg, pref. above 2500u/mg,
and a total coagulation activity (measured by APTT or USP titration) of
about 10. The ratio of Y-W to APTT or USP activity is above 200, pref.
above 250. (I) may be administered orally (pref. as gastroresistant

BEST AVAILABLE COPY

capsules, tablets or pills), rectally (suppositories), as aerosols or pomades or as injectable solutions. The solns. contain 1000-100,000 Y-W units per ml., pref. 5000-50,000, esp. 25,000 u/ml for sub-cutaneous injection and 500-10,000, esp. 5000 u/ml for perfusion or intravenous injection.

Title Terms: ANTITHROMBOTIC; HEXA; SACCHARIDE; COMPOSITION; HIGH; ACTIVE; REDUCE; HAEMORRHAGE; RISK; PREPARATION; DEGRADE; OCTA; SACCHARIDE; HEPARINASE; PREFER; FLAVOBACTERIUM

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): A61K-031/71; A61K-049/02; C07H-003/06; C07H-005/06; C07H-011/00; C08B-037/10; C12N-009/24; C12P-019/00

File Segment: CPI

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Numéro de publication:

0 064 452
A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 82400739.7

(51) Int. Cl.³: C 12 P 19/00
C 12 N 9/24, C 08 B 37/10

(22) Date de dépôt: 26.04.82

(30) Priorité: 29.04.81 FR 8108604

(43) Date de publication de la demande:
10.11.82 Bulletin 82/45

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE GB IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: CHOAY S.A.
48, Avenue Théophile-Gautier
F-75782 Paris Cédex 16(FR)

(72) Inventeur: Lormeau, Jean-Claude
1, rue Joseph Delattre
F-76150 Maromme(FR)

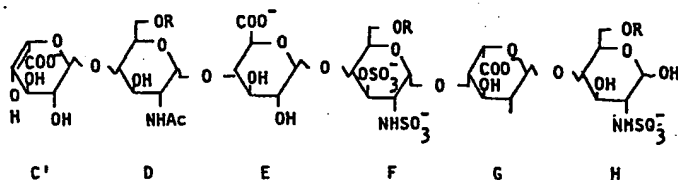
(72) Inventeur: Choay, Jean
21, Rue Saint-Guillaume
F-75007 Paris(FR)

(72) Inventeur: Petitou, Maurice
21, rue du Javelot Appart. 201
F-75645 Paris Cedex 13(FR)

(74) Mandataire: Peaucelle, Chantal et al,
Cabinet Plasseraud 84, rue d'Amsterdam
F-75009 Paris(FR)

(54) Oligosaccharides à chaînes courtes possédant des propriétés biologiques, leur préparation et leurs applications en tant que médicaments.

(57) Oligosaccharides à chaînes courtes de grande homogénéité structurale constitués essentiellement d'hexasaccharides de formule :



dans laquelle R représente un atome d'hydrogène ou le groupe $-SO_3^-$. Ces hexasaccharides possèdent une activité hautement sélective sur certaines étapes de la coagulation sanguine et sont utilisables comme médicaments antithrombotiques.

EP 0 064 452 A1

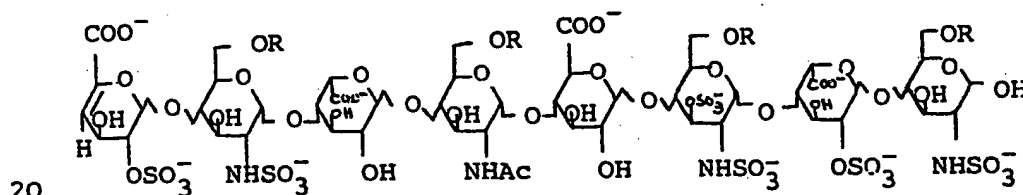
Oligosaccharides à chaînes courtes possédant des propriétés biologiques, leur préparation et leurs applications en tant que médicaments.

L'invention est relative à des oligosaccharides à chaînes courtes, possédant des propriétés biologiques leur permettant notamment de ne contrôler que certaines étapes de la coagulation sanguine.

5 Elle est relative à leur procédé d'obtention et à leurs applications en tant que principes actifs de médicaments.

Les inventeurs ont déjà décrit des oligosaccharides possédant des propriétés biologiques du type de
10 celles évoquées ci-dessus.

Par dépolymérisation de l'héparine par voie chimique ou enzymatique, les inventeurs ont notamment obtenu des octasaccharides de grande valeur répondant à la séquence A-B-C-D-E-F-G-H (désignée ci-après par
15 l'abréviation A-H).



A B C D E F G H
dans laquelle R représente un atome d'hydrogène ou un groupe $-SO_3^-$.

25 Ces octasaccharides s'avèrent particulièrement précieux en raison de leur spécificité élevée vis-à-vis du facteur X activé ou facteur Xa du sang (mesurée selon le test Yin-Wessler) alors que leur activité sur la coagulation globale (mesurée selon le test USP ou
30 APTT) est très faible.

Les références concernant la réalisation de ces différents tests seront données dans les exemples.

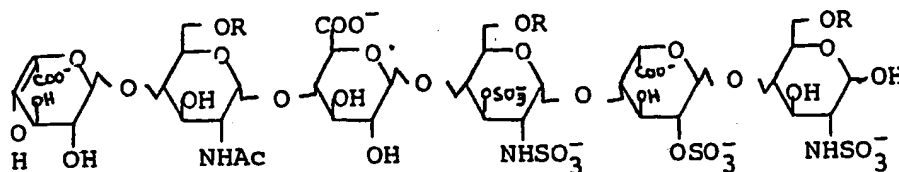
En poursuivant leurs travaux dans ce domaine, les inventeurs se sont intéressés, notamment, à l'obtention d'oligosaccharides à chaînes plus courtes que ces octasaccharides, mais possédant cependant un rapport avantageux de leur titre Yin-Wessler à leur titre USP ou APTT.

Ils ont ainsi été amenés à constater qu'en opérant dans des conditions bien déterminées, il était possible de raccourcir de manière sélective les chaînes actives des octasaccharides A-H et d'obtenir des compositions de grande homogénéité en oligosaccharides actifs à chaînes courtes.

L'invention a donc pour but de fournir de nouveaux oligosaccharides à chaînes plus courtes que les octasaccharides, possédant avantageusement au moins les propriétés biologiques de ces octasaccharides.

Elle vise également à fournir un procédé de mise en oeuvre aisée permettant d'éliminer de manière hautement sélective des motifs des octasaccharides A-H n'intervenant pas de manière essentielle dans l'activité biologique considérée de ces produits. Elle a également pour but de fournir des moyens d'obtention d'une enzyme particulièrement appropriée à la mise en oeuvre de ce procédé. Elle vise également à fournir des principes actifs de médicaments et les médicaments eux-mêmes capables d'inhiber le facteur Xa quand il est présent dans le sang avec un degré de sélectivité élevé tout en possédant une très faible activité sur la coagulation totale, et utilisables, de ce fait, pour les traitements antithrombotiques sans risque hémorragique pour le patient.

Les compositions d'oligosaccharides de grande homogénéité, selon l'invention, sont caractérisées en ce qu'elles sont formées essentiellement d'hexasaccharides possédant la séquence C'DEFGH (désignée ci-après par l'abréviation C'-H).



5

C' D E F G H

dans laquelle R représente un atome d'hydrogène ou le groupe $-\text{SO}_3^-$.

Les hexasaccharides de l'invention sont caracté-
10 risés par une affinité élevée pour l'ATIII.

Ils sont, en outre, caractérisés par des spectres RMN comprenant, entre autres, un signal dans la région du carbone en position 2 des résidus N-sulfate-glucosamine, qui n'apparaît pas avec l'héparine. Ce signal
15 peut être attribué à la présence d'un substituant sur l'atome d'oxygène en position 3, et plus particulièrement à un groupe 3-O-sulfate sur un résidu N-sulfate-D-glucosamine, (motif F du schéma).

Les hexasaccharides de l'invention sont, de plus,
20 caractérisés par des titres Yin-Wessler largement supérieurs à ceux de l'héparine. Plus spécialement, des compositions hexasaccharidiques de l'invention peuvent présenter des titres Yin-Wessler, supérieurs à 2000 u/mg, pouvant même atteindre 2500 u/mg environ. De ma-
25 nière avantageuse, leur titre APTT ou USP s'avère particulièrement faible, de l'ordre de 10, ce qui correspond à des compositions ayant des rapports de leur titre Yin-Wessler à leur titre USP ou APTT aussi élevés que 200, voire 250 environ.

30 Des compositions hexasaccharidiques avantageuses sont formées d'hexasaccharide C'-H dans lesquelles au moins un ou deux des groupes R représentent un groupe $-\text{SO}_3^-$.

L'invention vise également un procédé d'obtention
35 des compositions hexasaccharidiques évoquées ci-dessus.

Selon ce procédé, on soumet, dans des conditions

déterminées, des octasaccharides A-H, le cas échéant des compositions octasaccharidiques formées d'une majeure partie de ces octasaccharides A-H, à l'action d'une enzyme.

- 5 D'une manière inattendue, il s'est avéré que les octasaccharides A-H, qui peuvent être eux-mêmes obtenus par action d'une enzyme sur les chaînes d'héparine, sont cependant encore dégradables par voie enzymatique. En opérant dans des conditions déterminées, il est
- 10 alors possible d'éliminer des motifs n'intervenant pas de manière essentielle dans l'activité de ces produits, et ce avec une grande spécificité, ce qui permet d'obtenir des compositions hexasaccharidiques de grande homogénéité structurale.
- 15 Le procédé selon l'invention est donc caractérisé en ce qu'on met en contact les octasaccharides A-H évoqués ci-dessus, ou des compositions octasaccharidiques formées d'une majeure partie de ces octasaccharides, ayant un rapport élevé de leur titre Yin-Wessler à
- 20 leur titre APTT ou USP, avec un agent enzymatique dans des conditions ajustées de manière à fragmenter ces octasaccharides de manière spécifique afin d'éliminer les motifs A-B n'intervenant pas de manière essentielle dans l'activité considérée, cette spécificité condui-
- 25 sant à l'obtention de mélanges formés pratiquement totalement d'hexasaccharides actifs.

Selon une disposition de l'invention, ces conditions comprennent avantageusement la mise en oeuvre de l'enzyme à des concentrations élevées de l'ordre de

30 0,25 à 1 mg par mg d'octasaccharides traités, de préférence de l'ordre de 0,5 mg d'enzyme par mg d'octasaccharides.

Afin de disposer de compositions hexasaccharidiques hautement homogènes en hexasaccharides C'-H, on

35 a avantageusement recours à un traitement permettant de séparer du mélange de dégradation au moins la ma-

jeure partie des hexasaccharides C'-H actifs:

Un traitement approprié comporte un fractionnement réalisé afin d'éliminer les protéines résultant de la réaction enzymatique et les réactifs n'ayant pas
5 réagi. Ce fractionnement peut être réalisé, par exemple, par gel perméation selon le poids moléculaire et/ou la densité ionique des produits.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, l'octasaccharide A-H est soumis à l'action d'une enzyme.

10 Comme enzyme appropriée pour obtenir l'élimination sélective des motifs AB de l'octasaccharide A-H, on a avantageusement recours à une héparinase, plus spécialement une héparinase d'origine bactérienne.

Une telle héparinase est avantageusement du type
15 des héparinases pouvant être obtenues à partir des bactéries de *Flavobacterium heparinum*.

Pour une mise en oeuvre satisfaisante du procédé de l'invention d'obtention des hexasaccharides C'-H, on a plus spécialement recours à une héparinase telle
20 qu'obtenue selon un procédé comportant des étapes, notamment de culture des bactéries de *Flavobacterium heparinum* d'extraction de l'héparinase brute à partir de ces bactéries, et des purifications, réalisées de manière à obtenir une héparinase purifiée, ayant une
25 activité suffisamment élevée pour effectuer l'élimination souhaitée des motifs A-B avec des rendements satisfaisants.

Avantageusement, l'héparinase mise en oeuvre possède une activité héparinasique d'au moins environ
30 90.000 unités, de préférence supérieure à 100.000 unités, notamment de l'ordre de 110.000 à 140.000 unités.

L'activité de l'enzyme est évaluée, par rapport à l'augmentation de l'absorption d'une héparine titrant au moins 215 ui/mg à 230 nm.

35 Par unités, on entend alors, dans la description et les revendications, la quantité d'enzymes qui en-

traîne l'apparition d'une augmentation d'un millième d'unité de densité optique par minute.

Comme déjà indiqué, on met en oeuvre de 0,25 à 1 mg d'enzyme (ayant une activité de l'ordre d'au moins 90.000 unités) par mg d'octasaccharide de préférence environ 0,5 mg d'enzyme.

L'étude de l'action de l'enzyme sur l'octasaccharide a montré qu'il était approprié d'opérer à une température supérieure à l'ambiante notamment entre 10 35 et 40°C, de préférence de l'ordre de 37°C.

Dans ces conditions, une durée totale d'environ 24 heures apparaît satisfaisante.

On opère avantageusement, en milieu tampon, de préférence à un pH de l'ordre de 6 à 8, en particulier 15 voisin de la neutralité.

Compte tenu de la stabilité modérée de l'enzyme, il est préférable, afin d'augmenter son efficacité, de l'ajouter portions par portions, notamment à intervalles réguliers durant ce laps de temps.

20 On remarquera que, d'une manière avantageuse, le procédé de l'invention utilise un produit de départ, à savoir l'octasaccharide A-H de haute qualité : homogène, hautement spécifique.

Dans les conditions mises au point par les inventeurs, cet octasaccharide s'avère donc dégradable et 25 ce, de manière sélective, en conduisant à des chaînes plus courtes conservant la séquence responsable de l'activité de ces produits et possédant donc avantageusement des propriétés biologiques au moins aussi importantes, voire supérieures à celles de l'octasaccharide. 30

De préférence, le procédé de l'invention est mis en oeuvre avec une héparinase obtenue par induction à partir de bactéries de *Flavobacterium heparinum*, extraction de l'héparinase brute à partir des bactéries, 35 fractionnement de l'extrait brut d'héparinase obtenu suivi de plusieurs étapes de purifications des frac-

tions possédant l'activité héparinasique recherchée.

La préparation d'héparinase s'effectue à partir d'une culture de *Flavobacterium heparinum* faite dans les conditions décrites par Payza et Coll. (J. Biol. Chem. 1956, 223, p. 853-858).

En opérant à une température voisine de l'ambiante, sous aération et agitation moyenne, une durée de culture de l'ordre de 25 à 30 heures apparaît satisfaisante.

10 Les bactéries sont alors récupérées du milieu de culture par exemple par centrifugation, de préférence réalisée à basse température, notamment inférieure à 10°C, de préférence de l'ordre de 4°C.

Avant d'extraire l'héparinase, il est avantageux
15 de remettre en suspension les bactéries, puis après les avoir soumises à une opération de dispersion, de les lyophiliser.

Les bactéries sont alors soumises à un traitement en vue de l'extraction de l'héparinase. Ce traitement
20 comprend avantageusement un broyage puis leur récupération par exemple par centrifugation.

Afin d'obtenir une extraction satisfaisante, il convient d'effectuer plusieurs broyages, par exemple, tout d'abord à sec puis en milieu tampon de pH de
25 l'ordre de 6 à 8, avantageusement de 7 ou voisin de 7.

L'extrait brut d'héparinase récupéré par centrifugation est soumis, aux fins de purification, à une étape de fractionnement. Pour disposer d'une héparinase possédant l'activité et les propriétés recherchées, on
30 procède avantageusement à des opérations supplémentaires de purification des fractions successivement obtenues. L'étude de ces processus de fractionnement et de purification a montré qu'il était préférable d'opérer à une température inférieure à l'ambiante, en particulier inférieure à 10°C, de préférence de l'ordre de
35 + 4°C.

L'étape de fractionnement est avantageusement réalisée notamment selon un processus de chromatographie d'exclusion à l'aide de DEAE cellulose, en présence de sulfate d'ammonium.

5 Dans une première étape en batch, on utilise avantageusement la DEAE cellulose à raison d'environ au moins 3 g par g de cellules bactériennes, de préférence de l'ordre de 5 g.

10 La DEAE cellulose est avantageusement équilibrée au préalable à l'aide d'un tampon de pH de l'ordre de 6 à 8, de préférence de l'ordre de 7.

Le sulfate d'ammonium est mis en oeuvre à raison d'environ au moins 3 g/l, de préférence de l'ordre de 6 g/l.

15 La suspension ainsi formée est filtrée et le filtrat est recueilli, additionné avantageusement des solutions de rinçage de la DEAE cellulose. Dans une deuxième étape, la solution préalablement obtenue est soumise à un fractionnement supplémentaire à l'aide
20 de DEAE cellulose, avantageusement prééquilibrée à l'aide du tampon utilisé précédemment. Cette étape est réalisée avec avantage par chromatographie dans une colonne, les filtrats étant percolés à un débit de l'ordre de 40 à 60 ml/h.

25 A partir de l'effluent, on récupère l'héparinase, par exemple, par précipitation, notamment à l'aide de sulfate d'ammonium.

L'héparinase obtenue à l'issue de cette opération de fractionnement, qui, dans les conditions particulières rapportées ci-dessus, se trouve sous forme d'un précipité sulfo-ammonique, est ensuite avantageusement purifiée selon un processus comportant au moins une
30 mise en contact avec un agarose du type du Sépharose, plus spécialement celui connu sous la dénomination CM Sépharose CL 6 B, suivie d'une mise en contact des
35 fractions purifiées, à activité héparinasique recueil-

lies avec un agarose du type de celui commercialisé sous la dénomination ULTRAGEL ACA 54.

L'étape de purification à l'aide d'un agarose du type du CM Sépharose CL 6 B est avantageusement
5 réalisée dans une colonne de chromatographie.

Il apparaît souhaitable de dissoudre dans de l'eau distillée l'héparinase (qui se trouve sous forme de précipité sulfoammonique), de manière à obtenir une solution ayant une conductivité de l'ordre de 6000
10 micromhos et d'ajuster son pH à environ 6.

L'agarose mis en oeuvre est avantageusement équilibré au préalable à l'aide d'un tampon de pH de l'ordre de 5 à 7, de préférence voisin de 6.

Après avoir lavé la colonne de préférence à l'ai-
15 de du tampon de lavage, on effectue la chromatographie de la solution d'héparinase et on récupère l'héparinase par élution par un gradient linéaire obtenu avec le tampon utilisé pour le lavage et ce même tampon amené à une force ionique plus élevée.

20 Les fractions possédant l'activité héparinasique recherchée sont récupérées pour recueillir l'héparinase qu'elles renferment. On effectue, par exemple, une précipitation notamment à l'aide de sulfate d'ammonium, suivie d'une centrifugation.

25 Comme déjà indiqué, il est avantageux de procéder à une purification supplémentaire de l'héparinase recueillie en opérant une nouvelle mise en contact avec un agarose, de préférence, un agarose tel que l'ULTROGEL ACA 54. Cette opération est, de préférence,
30 réalisée dans une colonne équilibrée à l'aide d'un tampon de pH de l'ordre de 6 à 8, notamment de l'ordre de 7.

Ce tampon est avantageusement utilisé pour développer la colonne.

35 On récupère ainsi des fractions à haute activité héparinasique.

Comme déjà décrit par les inventeurs, l'octasaccharide A-H mis en oeuvre dans le procédé de l'invention peut être obtenu par mise en contact de l'héparine (ou de fractions hépariniques) possédant une
5 activité anticoagulante et des chaînes ayant un poids moléculaire de l'ordre de 2000 à 50.000 environ, avec un agent enzymatique, de préférence une héparinase purifiée, plus spécialement, d'origine bactérienne possédant une activité de l'ordre de 45.000 unités, étant
10 entendu que le dosage est effectué avec une héparine titrant au moins 215 ui/mg. Les conditions utilisées pour la réalisation de cette étape sont ajustées de manière à obtenir un mélange de dépolymérisation contenant des chaînes octasaccharidiques ayant une activité anti-Xa (Yin-Wessler) et comprenant une séquence
15 responsable de l'activité spécifique anti-Xa de ces produits.

L'enzyme provoque la coupure des chaînes hépariniques entre le carbone anomère du résidu N-sulfate-
20 glucosamine et du motif acide uronique suivant.

Les octasaccharides biologiquement actifs sont alors séparés du mélange de dépolymérisation par adsorption sur l'antithrombine III (ATIII) fixée sur un support tel que l'agarose, dans des conditions permettant aux octasaccharides ayant une affinité pour
25 l'ATIII d'être fixés ou retenus sur l'ATIII.

Cette étape est avantageusement suivie de l'élu-
tion des produits retenus ou adsorbés afin de les récupérer et par leur fractionnement, par exemple par gel
30 filtration afin de les isoler.

Ces oligosaccharides apparaissent capables d'exercer une activité antithrombotique puissante. En raison de leur activité anticoagulante faible et même pratiquement nulle, les risques d'hémorragie sont avantageusement pratiquement éliminés. On a de plus constaté
35 que ce type d'oligosaccharides ne provoque aucune

réactivité des plaquettes du sang.

Les hexasaccharides à chaînes courtes de l'invention sont dépourvus de toxicité. L'administration de 10.000 u/kg (titre Yin-Wessler) de C'-H ne provoque
5 chez le lapin aucune réaction toxique, ni d'effet pyrogénique dans le test de pyrogénicité chez le lapin conforme à la pharmacopée française.

L'administration à des souris de doses aussi importantes que 3200 mg/kg n'a pas permis de déterminer
10 la DL₅₀.

L'invention est donc relative à des préparations pharmaceutiques qui renferment lesdits hexasaccharides à activité anti-Xa élevée.

Elle est plus particulièrement relative à des
15 préparations pharmaceutiques dépourvues de substances pyrogènes contenant une quantité efficace de principes actifs en association avec des excipients pharmaceutiques.

Elle concerne également les compositions dans
20 lesquelles le véhicule pharmaceutique est approprié pour l'administration par voie orale. Des formes d'administration de l'invention appropriées pour l'administration par voie orale peuvent être avantageusement des gélules gastrorésistantes, des comprimés ou ta-
25 blettes, des pilules, ou encore présentées sous forme de liposomes.

D'autres compositions pharmaceutiques comprennent ces oligosaccharides en association avec les excipients appropriés pour l'administration par voie rectale. Des
30 formes d'administration correspondantes sont constituées par des suppositoires.

D'autres formes d'administration de l'invention sont constituées par des aérosols ou des pommades.

L'invention concerne également des compositions
35 pharmaceutiques injectables, stériles ou stérilisables.

Ces solutions renferment avantageusement 1000 à

100.000 u (Yin-Wessler)/ml d'oligosaccharides, de
préférence de 5000 à 50.000, par exemple de 25.000 u/ml,
lorsque ces solutions sont destinées à l'injection par
voie sous-cutanée. Elles peuvent contenir, par exemple,
5 de 500 à 10.000, notamment 5000 u/ml d'oligosacchari-
des lorsqu'elles sont destinées à l'injection par voie
intraveineuse ou par perfusion.

Avantageusement, de telles préparations pharmaceu-
tiques sont présentées sous la forme de seringues non
10 récupérables, prêtes à l'emploi.

L'invention concerne également les compositions
pharmaceutiques contenant lesdits oligosaccharides en
association avec un autre principe actif, utilisable
en particulier pour la prophylaxie et le traitement
15 de thrombose, tel qu'un agent veinotonique comme la
dihydroergotamine, un sel d'acide nicotinique ou un
agent thrombolytique comme l'urokinase.

Les oligosaccharides à chaînes courtes de l'in-
vention sont avantageusement sous la forme de sels
20 d'au moins un métal physiologiquement acceptable tel
que le sodium et/ou le calcium et/ou le magnésium.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention
sont particulièrement adaptées pour le contrôle (pré-
ventif ou curatif) de certaines étapes de la coagula-
25 tion du sang chez l'homme ou l'animal), notamment dans
le cas où le patient est soumis à des risques d'hyper-
coagulabilité résultant d'une perturbation en phase
intrinsèque, par exemple comme conséquence d'une libé-
ration par l'organisme de thromboplastines, par exem-
30 ple, de thromboplastines tissulaires (opérations chi-
rurgicales, processus atheromateux, développement de
tumeurs et troubles de la coagulation par des activa-
teurs bactériens ou enzymatiques, etc).

Afin d'illustrer l'invention, on indique, ci-
35 après, un exemple de posologie utilisable chez l'homme:
cette posologie comprend, par exemple, l'administration

- au patient de 1000 à 25.000 u (Yin et Wessler) par voie sous-cutanée, deux ou trois fois par jour, selon le niveau des risques d'hypercoagulabilité ou la condition thrombotique du patient, ou de 1000 à 25.000 u/
- 5 24 heures par voie intraveineuse, en administrations discontinues à intervalles réguliers, ou continues par perfusion, ou encore de 1000 à 25.000 u (trois fois par semaine) par voie intramusculaire ou sous-cutanée (ces titres sont exprimés en unités Yin-Wessler). Ces
- 10 doses peuvent être naturellement ajustées pour chaque patient en fonction des résultats et des analyses de sang effectuées auparavant, la nature des affections dont il souffre et, d'une manière générale, son état de santé.
- 15 L'invention se rapporte également à l'application des oligosaccharides de l'invention et des fractions qui les renferment, à la constitution de réactifs biologiques, utilisables en laboratoires, notamment comme éléments de comparaison pour l'étude d'autres substances dont on souhaite tester l'activité anticoagulante,
- 20 notamment au niveau de l'inhibition du facteur Xa.
- Elle vise également l'application des fractions et oligosaccharides en médecine nucléaire, en tant que produits radiopharmaceutiques. Les oligosaccharides
- 25 et fractions définis ci-dessus sont marqués par des traceurs choisis parmi ceux couramment utilisés dans ce domaine, et notamment à l'aide de technétium 99 m.
- A cet effet, on transforme le technétium 99 m obtenu à partir de générateurs du commerce, sous forme
- 30 de pertechnétate de sodium de valence 7 non réactif, en technétium réduit de valence 4 qui serait la forme la plus réactive du technétium. Cette transformation est effectuée grâce à un système réducteur réalisé à partir de sels d'étain (chlorure stanneux), de sels de
- 35 fers (sulfate ferreux), de sels de titane (trichlorure de titane) ou autres sels.

La plupart du temps, cette simple réduction du technétium suffit dans des conditions de pH données, à réaliser la fixation du technétium sur la molécule considérée.

5 On peut utiliser les produits de l'invention, qui constituent en quelque sorte un support, à des doses de l'ordre de 100 à 200 ui Yin-Wessler.

Pour l'élaboration de ces réactifs radiopharmaceutiques, on peut opérer conformément à la méthode de
10 P.V. KULKARNI et al. dans The Journal of Nuclear Medicine 21, N° 2, p. 117-121.

Les produits ainsi marqués sont avantageusement utilisés dans des tests in vivo pour la détection et le diagnostic d'extension des thromboses et des états
15 thrombotiques.

EXEMPLE 1.

Procédé d'obtention des hexasaccharides actifs C'-H par action d'une héparinase sur l'octasaccharide A-H.

Ce procédé comporte les trois étapes 1 à 3 suivantes :
20

- 1) la préparation de l'héparinase ;
- 2) l'action de l'héparinase sur l'octasaccharide A-H aux fins de dégradation sélective, suivie par
- 3) le fractionnement du mélange de dégradation par
25 filtration sur gel, et la récupération des fractions renfermant les hexasaccharides recherchés.

Ces étapes sont réalisées comme suit :

1) Préparation de l'héparinase.

On utilise des enzymes provenant de la culture de
30 flavobacterium heparinum obtenues en procédant comme suit :

Dans un fermenteur de 18 litres, du type de celui commercialisé sous la marque BIOLAFFITE, on réalise la culture de flavobacterium heparinum ATCC 13125, durant
35 26 heures dans un bouillon de culture répondant à la composition suivante (en grammes par litre d'eau dis-

tillée).

Bouillon de culture de Flavobacterium

heparinum arrivé en phase stationnaire : 500 ml

Phosphate de sodium monosodique : 2,5

5 Phosphate de sodium disodique : 25

Sulfate d'ammonium : 1

K Cl : 0,1

Héparinate de sodium de titre égal ou supérieur à 150 ui/mg qualité Codex : 3

10 Chlorure de calcium : 0,01

Chlorure ferrique : 0,01

Sulfate de magnésium : 0,01

Chlorure de manganèse : 0,01

Molybdate de sodium : 0,01

15 Le pH du bouillon est finalement ajusté à 7,0 avec de l'acide phosphorique ou de la soude.

Cette culture est réalisée à une température de + 24°C sous aération et agitation moyenne.

Après 26 heures de culture, le milieu est refroidi à + 4°C en un laps de temps d'environ 2 heures.

20 Les bactéries sont récupérées par centrifugation à 50.000 t/mn, sur une centrifugeuse du genre de la centrifugeuse SHARPLESS pneumatique type T 313 A et ce durant 2 heures. Le culot de centrifugation est repris

25 dans 1 litre d'eau distillée froide, soumis à une dispersion par turbine ULTRA-TURAX à vitesse maximum pendant 5 minutes, puis lyophilisé. La durée totale de cette opération est d'environ 36 heures. Dans ces conditions, on obtient 4,1 grammes de cellules.

30 8 - Extraction des cellules.

Les cellules, lyophilisées, obtenues selon l'étape précédente, sont broyées vigoureusement à sec, au mortier, en présence de 2 g d'alumine calcinée, pendant 1 heure. On ajoute alors 10 ml de tampon 1) (tampon

35 acétate de sodium 0,1 M, pH 7). Le broyage au mortier de la pâte alors obtenue est poursuivi pendant 30 mi-

- notes à + 4°C. On ajoute ensuite 450 ml de tampon 1) froid et on laisse l'ensemble sous agitation pendant 1 heure à + 4°C. La suspension obtenue est centrifugée sur une centrifugeuse du type SORVALL RC2 B, à 18.000 t/mn à + 4°C, pendant 20 minutes. Les culots de centrifugation composés d'alumine et de débris cellulaires sont écartés. On recueille le surnageant (jaune orangé et visqueux) qui constitue l'extrait cellulaire brut, et correspond à un volume de 470 ml.
- 5 18.000 t/mn à + 4°C, pendant 20 minutes. Les culots de centrifugation composés d'alumine et de débris cellulaires sont écartés. On recueille le surnageant (jaune orangé et visqueux) qui constitue l'extrait cellulaire brut, et correspond à un volume de 470 ml.
- 10 La suite des manipulations est effectuée à + 4°C.
- γ - Chromatographie d'exclusion par DEAE cellulose.
- Sous agitation, à + 4°C, on ajoute 2,82 g de sulfate d'ammonium au surnageant précédemment obtenu, puis 21 g de DEAE cellulose préalablement équilibrée
- 15 en tampon 2) (tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 7 contenant 6 g/l de sulfate d'ammonium. On soumet l'ensemble à agitation durant 2 heures à + 4°C avec contrôle et ajustement éventuel du pH 7,0. On sépare ensuite la DEAE cellulose par filtration sur büchner et
- 20 on la lave avec du tampon 2) froid, jusqu'à absence de protéines dans les solutions de lavage. On passe l'ensemble filtrat et solutions de lavage (680 ml) sur une colonne de 400 ml (23 = 5 cm) de DEAE cellulose prééquilibrée en tampon 2), à + 4°C, à un débit
- 25 de 50 ml/h. La colonne est finalement rincée par du tampon 2), jusqu'à absence de protéines dans les solutions de rinçages. On réunit les effluents de colonne et les solutions de rinçages, ce qui correspond à un volume de 1100 ml et on ajoute 715 g de sulfate d'am-
- 30 monium, sous agitation. On recueille par centrifugation à 7000 t/mn les protéines précipitées et ce durant 30 minutes, sur une centrifugeuse du genre SORVALL. On recueille 2,5 g de précipité très humide qui constitue l'héparinase. Ce précipité peut être
- 35 stocké à - 20°C durant plusieurs semaines.

c - Chromatographie sur CM Sépharose CL 6 B.

On dissout le précipité sulfoammonique précédemment obtenu dans de l'eau distillée froide utilisée en quantité suffisante pour obtenir une conductivité finale de 6000 micromhos. On ajuste le pH de la solution obtenue à 6,0 par de l'acide acétique ou de la soude 2 N. Le volume final est de 440 ml. La solution est alors percolée à + 4°C sur une colonne de 70 ml (15 x 2,6 cm) de CM Sépharose CL 6 B préalablement é-

5

10

quilibrée en tampon 3) (tampon acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,22 M, pH 6,0), à un débit de 25 ml/h. On rince la colonne par le tampon 3) jusqu'à absence de protéines dans l'effluent. Les effluents de colonne sont écartés.

15 L'héparinase est ensuite éluée à 60 ml/h à l'aide d'un gradient linéaire formé à partir de 600 ml de tampon 3) et de 600 ml de tampon 3) ajusté à 0,34 M de NaCl.

Les protéines sortant de la colonne sont détectées par enregistrement en continu de la densité optique (D.O.) à 280 nm et l'éluat est recueilli par fractions de 5 ml à l'aide d'un collecteur de fractions.

20

Sur la figure 1, on a représenté le graphique d'élution obtenu par enregistrement de la D.O. à 280 nm de l'effluent de colonne.

25

L'activité héparinasique de chaque fraction est dosée. On regroupe les fractions 45 à 48 (partie D du graphique) à haute teneur en héparinase. Ces fractions correspondent à un volume de 45 ml.

30 On précipite les protéines par addition de 30 g de sulfate d'ammonium et on les récupère par centrifugation à + 4°C à 15.000 t/mn, durant 10 minutes.

- Gel filtration sur ULTROGEL ACA 54.

On dissout le culot de centrifugation précédemment obtenu dans de l'eau distillée froide et on obtient un volume final de 5 ml. Cette solution est déposée au

35

sommet d'une colonne (1 m x 26 mm) d'ULTROGEL ACA 54 équilibrée en tampon acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,33 M, pH 7. La colonne est développée par ce même tampon à un débit de 15 ml par heure. Comme précédemment, les protéines sortant de la colonne sont détectées à 280 nm, et l'effluent de colonne est recueilli par fractions de 5 ml. Le graphique d'élution est représenté sur la figure 2. L'activité héparinasique de chaque fraction est dosée. Les fractions 32 à 37 (partie F du graphique), qui contiennent l'activité héparinasique, sont regroupées, ce qui correspond à un volume de 60 ml. Cette solution contient 7 mg d'héparinase purifiée, présentant une activité de l'ordre de 100.000 à 110.000 unités/mg. (On considère, comme unité d'enzyme, la quantité d'enzyme qui fait apparaître à 231 nm, un millième d'unité de densité optique par mn lorsqu'on met en contact à 38°C, de l'héparinase avec de l'héparine titrant au moins 215 ui/mg 0,065 % en tampon tris-HCl, 0,125 M, pH 7, dans lequel on ajoute du chlorure de calcium CaCl_2).

La solution obtenue est conservée et congelée à - 20°C.

2) Dégradation de l'octasaccharide par l'héparinase.

On dissout 10 mg d'octasaccharide A-H (lot BC IV 135), obtenu selon le procédé décrit dans la demande de brevet déposée par la demanderesse en Grande-Bretagne le 2 Juillet 1980 N° 80/21749, ayant une activité anti-Xa (Yin-Wessler) de 2100 u/mg, dans 10 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M de chlorure de calcium pH 7,2.

La solution est incubée à + 37°C. L'addition d'héparinase est effectuée comme suit.

Au temps $t = 0$, on ajoute 17 ml de la solution d'héparinase obtenue précédemment (soit 2 mg d'héparinase) : au temps $t_1 = 8$ heures, on ajoute de nouveau 17 ml de solution d'héparinase : au temps $t_2 = 16$ heures, on ajoute finalement 8,5 ml de solution d'hépari-

nase. Au temps $t_3 = 24$ heures, on procède à l'évaporation à sec sous vide à 40°C , des 52,5 ml de solution sur un appareil du type Rotavapor BUCHI.

3) Fractionnement du mélange de dégradation par filtration sur gel.

On dépose le mélange obtenu à l'issue de l'étape de dégradation au sommet d'une colonne de Séphadex G-50 superfine (200 x 2,5 cm). On procède à l'élution des produits à l'aide de chlorure de sodium 0,2 M. Les produits sont détectés par leur absorption à 230 nm. On rapporte sur la figure 3 le diagramme d'élution obtenu. On distingue 3 fractions principales. La première est constituée par du matériau de départ non dégradé (4 mg), la deuxième renferme les hexasaccharides recherchés (7 mg) et la troisième des disaccharides. On distingue également une fraction de moindre importance dans la région des tétrasaccharides entre les pics des hexa et des disaccharides.

On rassemble les fractions hexasaccharidiques, on élimine les sels et on les lyophilise.

- Etude de la structure des hexasaccharides des fractions recueillies.

On procède à une étude de structure de ces fractions par analyse colorimétrique des fragments obtenus par dégradation à l'aide d'acide nitreux suivie d'une gel filtration. La dégradation, à l'aide d'acide nitreux, est effectuée selon la méthode de SHIVELY et CONRAD décrite dans Biochemistry, vol. 15, N° 12, 1976, p. 3932 à 3942.

L'action de l'acide nitreux se traduit par une coupure des liaisons glycosidiques entre les motifs N-sulfate-glucosamine et l'acide uronique suivant et transforme les motifs sulfate-glucosamine en résidus 2,5-anhydromannose.

L'hexasaccharide est alors transformé en tétrasaccharide et en disaccharide. On sépare ces deux

oligosaccharides par filtration sur une colonne (200 x 0,6 cm) de Séphadex G-50 Superfine, éluée avec du chlorure de sodium 0,2 M. Sur la figure 4, on rapporte les valeurs de la densité optique mesurée à 230 nm, des fractions éluées (courbe a) en traits continus) ainsi que leur teneur en groupes 2,5-anhydromannose (courbe b) en pointillés), acides uroniques (courbe c) en tirets ----) et N-acétyl-glucosamine (courbe d) en tirets alternant avec des points -.-.-.) (pour la détermination de ce dernier groupe, on effectue des mesures avant et après hydrolyse acide, la différence obtenue correspondant à la teneur en groupes N-acétyl-glucosamine).

Il ressort de l'examen de la figure 4 (la flèche sur la figure 4 indique le volume d'élution pour l'hexasaccharide original) que les motifs acide uronique insaturé qui absorbent la lumière à 230 nm sont contenus dans la fraction tétrasaccharidique tandis que la fraction disaccharidique est pratiquement totalement dépourvue de tels composés.

De la même manière, il apparaît que les groupes N-acétyl-glucosamine sont seulement présents, comme prévu, dans la fraction tétrasaccharidique.

La teneur en groupe acide uronique apparaît deux fois plus importante dans la fraction tétrasaccharidique que dans la fraction disaccharidique.

On constate, par ailleurs, que les groupes 2,5-anhydromannose sont présents de manière équivalente dans les deux fractions, ce qui implique que les disaccharides et les tétrasaccharides sont obtenus dans un rapport molaire 1/1. Ces résultats montrent qu'une coupure a été opérée sur l'hexasaccharide, donnant lieu au disaccharide ne portant pas de double liaison et au tétrasaccharide (coupure entre F et G).

En outre, ces résultats établissent que la fraction hexasaccharidique est presque exclusivement cons-

tituée par une seule espèce qui porte un motif N-sulfate-glucosamine à son extrémité réductrice, un motif acide uronique insaturé à son extrémité non réductrice.

La comparaison avec la structure de l'octasaccharide de départ permet de conclure que deux autres motifs de glucosamine dont l'un est N-acétylé et l'autre N-sulfaté-3-O-sulfaté, et deux autres résidus d'acide uronique (un glucuronique et un iduronique-2-O-sulfaté) complètent la séquence hexasaccharidique.

- 10 - Etude de l'activité biologique in vitro et in vivo de la fraction hexasaccharidique obtenue selon le procédé décrit ci-dessus.

On détermine l'activité anti-Xa selon le test de Yin-Wessler décrit par ses auteurs dans J. Lab.Clin.
15 Med. 1976, 81, 298-300.

L'activité anticoagulante globale est mesurée selon le test USP ou la méthode APTT.

Le test USP est décrit dans "Pharmacopea of the United States of America", XIX, pages 229-230 (voir
20 également le deuxième supplément USP-NF, page 62, et le quatrième supplément USP-NF, page 90, respectivement intitulés "Drug substances" et "Dosage forms").

Le titre APTT est mesuré selon la méthode de J. CAEN et al. dans l'Hémostase, expansion scientifique
25 française, Paris, 1968, pages 133-135.

L'activité antithrombotique in vivo est étudiée en utilisant la méthode de Wessler et al. décrite dans J. of appl. physiol. 1959, 14, 943-946, en utilisant un stimulant thrombogénique différent.

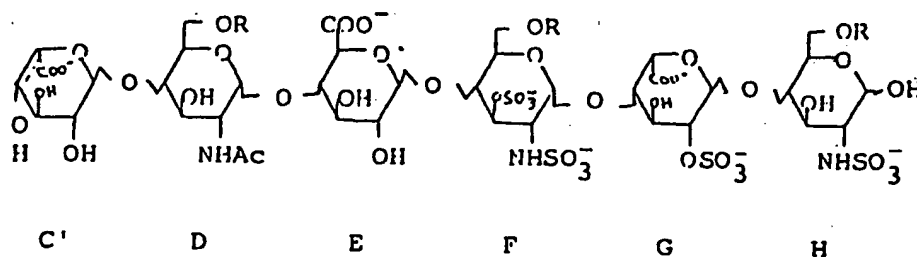
- 30 - Activité anti-Xa (Yin-Wessler) : 2400 u/mg.
- Titre USP et titre APTT inférieurs à 10 u/mg.

L'activité de cette fraction hexasaccharidique a été étudié in vivo sur le lapin selon le modèle de Wessler. L'administration de 250 u anti-Xa par kg
35 avant administration de 25 u/kg d'un complexe thrombogénique (complexe cencentré de prothrombine vendu sous

le nom de Konyn par Cutter Laboratories, U.S.A.),
empêche la formation de thrombus.

REVENDEICATIONS

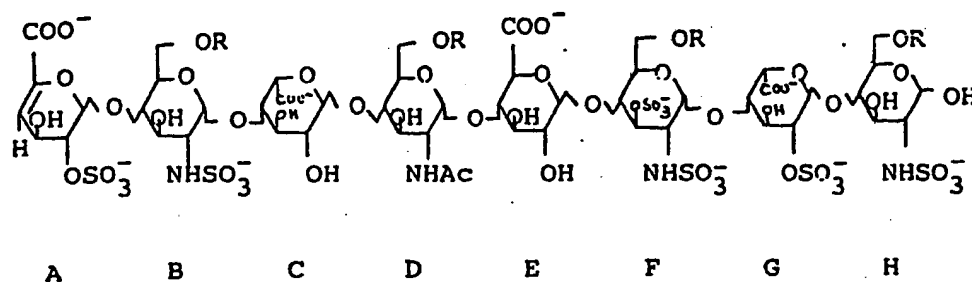
1. Compositions d'oligosaccharides à chaînes courtes, caractérisées en ce qu'elles sont formées essentiellement d'hexasaccharides possédant la séquence désignée ci-après par l'abréviation C'-H :



dans laquelle R représente un atome d'hydrogène ou le groupe $-SO_3^-$ et leurs sels physiologiquement acceptables.

2. Compositions selon la revendication 1, caractérisées en ce que lesdits hexasaccharides possèdent des titres Yin-Wessler supérieurs à 2000 u/mg, avantageusement 2500 u/mg.
3. Compositions selon la revendication 1 ou 2, caractérisées par des titres APTT ou USP de l'ordre de 10.
4. Compositions selon la revendication 2 ou 3, caractérisées par des titres Yin-Wessler et des titres USP ou APTT dans un rapport de l'ordre de 200, voire de 250 environ.
5. Compositions selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles sont formées d'hexasaccharides C'-H dans lesquels au moins un ou deux des groupes R représente un groupe $-SO_3^-$.
6. Procédé de préparation de compositions selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on met en contact des octasaccharides répondant à la séquence ABCDEFGH (désignée ci-après

par l'abréviation A-H), de formule



- ou des compositions octasaccharidiques formées d'une majeure partie de ces octasaccharides, ayant un rapport élevé de leur titre Yin-Wessler à leur titre APTT ou USP, avec un agent enzymatique dans des conditions ajustées de manière à fragmenter ces octasaccharides de manière spécifique afin d'éliminer les motifs A-B.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre comme enzyme, une héparinase, plus spécialement une héparinase d'origine bactérienne telle que celle pouvant être obtenue à partir des bactéries de *Flavobacterium heparinum*.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'héparinase mise en oeuvre possède une activité héparinasique d'au moins environ 90 000 unités, notamment de l'ordre de 110 000 à 140 000 unités (le dosage étant effectué avec une héparine titrant au moins 215ui/mg à 230 nm), cette enzyme étant mise en oeuvre à des concentrations de l'ordre de 0,25 à 1 mg par mg d'octasaccharides traités de préférence de l'ordre de 0,5 mg d'enzymes par mg d'octasaccharides.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, pour disposer de compositions hexasaccharidiques hautement homogènes

en hexasaccharides C₁H, on soumet le mélange résultant de la réaction enzymatique, à un fractionnement par exemple par gel perméation selon le poids moléculaire et/ou la densité ionique du produit.

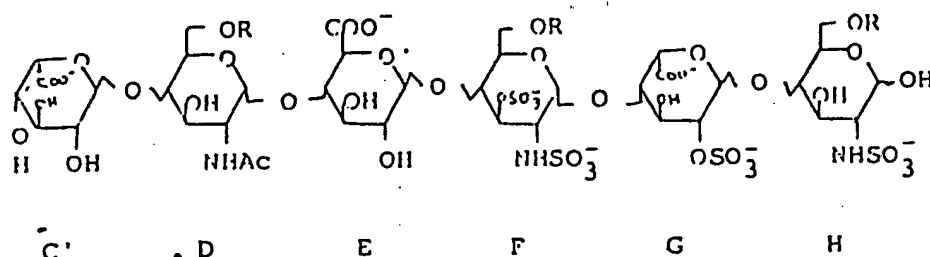
- 5 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce qu'on opère à une température supérieure à l'ambiante, notamment entre 35 et 40°C, de préférence de l'ordre de 37 °C, en milieu tampon de préférence à un pH de l'ordre de 6 à 8, en particulier voisin de la neutralité.
- 10 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce qu'on ajoute l'enzyme portion par portion, notamment à intervalles réguliers.
12. Médicaments, caractérisés en ce qu'ils
- 15 renferment une quantité efficace d'au moins une composition d'oligosaccharides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.
13. Médicaments selon la revendication 12, caractérisés en ce qu'ils se présentent sous des formes
- 20 appropriées pour l'administration par voie orale, avantageusement sous forme de gélules gastrorésistantes, de comprimés ou tablettes, de pilules, ou encore sous forme de liposomes, ou encore sous forme appropriée pour l'administration par voie rectale, sous forme de suppositoires, ou bien sous forme d'aérosols ou de pommades,
- 25 ou encore sous forme de compositions injectables, utilisables pour le traitement préventif ou curatif de thromboses.
14. Médicaments selon la revendication 13, caractérisés en ce qu'ils se présentent sous forme de
- 30 compositions pharmaceutiques injectables renfermant de 1000 à 100 000 u (Yin-Wessler) par ml d'hexasaccharides, de préférence de 5 000 à 50 000, notamment de 25 000 u/ml lorsque ces solutions sont destinées à l'injection par voie sous-cutanée et de 500 à 10 000, notamment de 5000 u/ml
- 35 d'hexasaccharides lorsqu'elles sont destinées à l'injection

par voie intraveineuse ou par perfusion.

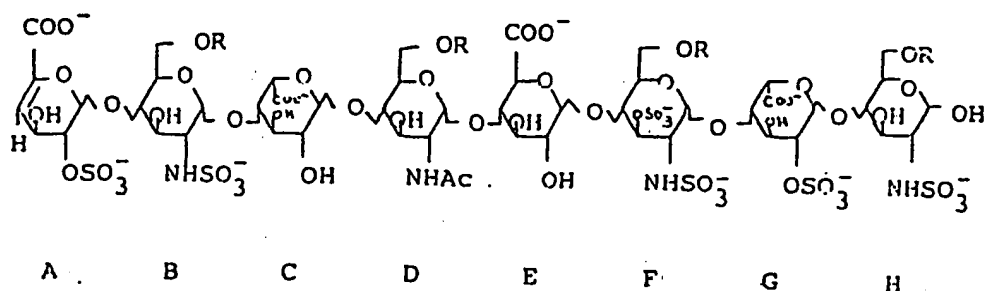
15. Utilisation des médicaments selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, en tant que produits radiopharmaceutiques.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de composition d'oligosaccharides à chaînes courtes, formées essentiellement d'hexasaccharides possédant la séquence désignée ci-après par l'abréviation C'-H :



- dans laquelle R représente un atome d'hydrogène ou le groupe $-SO_3^-$ et leurs sels physiologiquement acceptables, caractérisé en ce qu'on met en contact des octasaccharides répondant à la séquence ABCDEFGH (désignée ci-après par l'abréviation A-H), de formule



- ou des compositions octasaccharidiques formées d'une majeure partie de ces octasaccharides, ayant un rapport élevé de leur titre Yin-Wessler à leur titre APTT ou USP, avec un agent enzymatique dans des conditions ajustées de manière à fragmenter ces octasaccharides de manière spécifique afin d'éliminer les motifs A-B.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on met en oeuvre comme enzyme, une héparinase, plus spécialement une héparinase d'origine bactérienne telle que celle pouvant être obtenue à partir des bactéries de *Flavobacterium heparinum*.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'héparinase mise en oeuvre possède une activité héparinasique d'au moins environ 90 000 unités, notamment de l'ordre de 110 000 à 140 000 unités (le dosage étant effectué avec une héparine titrant au moins 215ui/mg à 230 nm), cette enzyme étant mise en oeuvre à des concentrations de l'ordre de 0,25 à 1 mg par mg d'octasaccharides traités de préférence de l'ordre de 0,5 mg d'enzymes par mg d'octasaccharides.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, pour disposer de compositions hexasaccharidiques hautement homogènes en hexasaccharides C1H, on soumet le mélange résultant de la réaction enzymatique, à un fractionnement par exemple par gel perméation selon le poids moléculaire et/ou la densité ionique du produit.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on opère à une température supérieure à l'ambiante, notamment entre 35 et 40°C, de préférence de l'ordre de 37 °C, en milieu tampon de préférence à un pH de l'ordre de 6 à 8, en particulier voisin de la neutralité.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on ajoute l'enzyme portion par portion, notamment à intervalles réguliers.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les hexasaccharides obtenus possèdent des titres Yin-Wessler supérieurs à 2000 u/mg, avantageusement 2500 u/mg.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les hexasaccharides obtenus possèdent des titres APTT ou USP de l'ordre de 10.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les compositions obtenues possèdent des titres Yin-Wessler et des titres USP ou APTT dans un rapport de l'ordre de 200, voire de 250 environ.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'il conduit à l'obtention d'hexasaccharides C'-H dans lesquels au moins un ou deux des groupes R représente un groupe $-SO_3^-$.

FIG. 1.

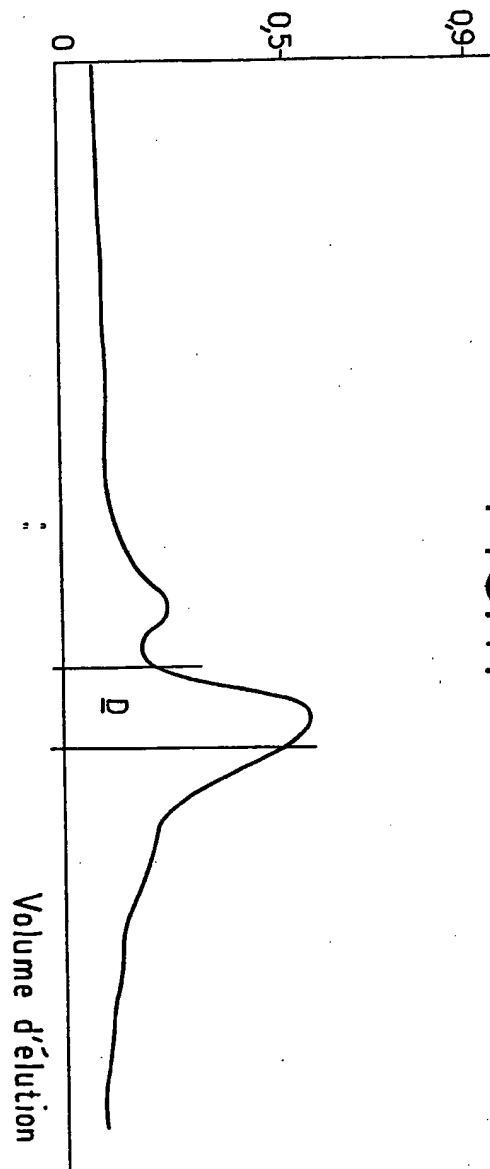
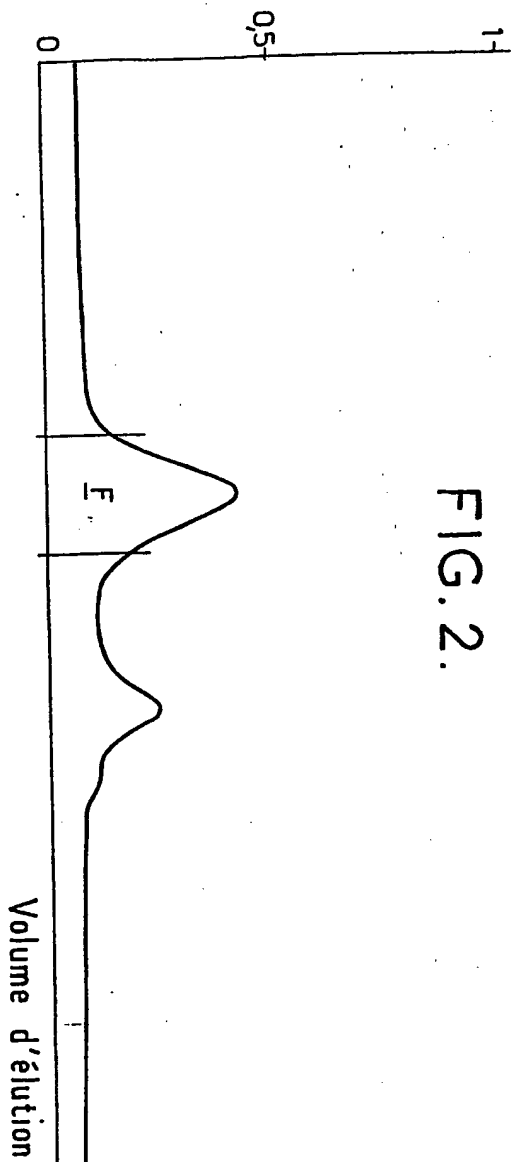


FIG. 2.



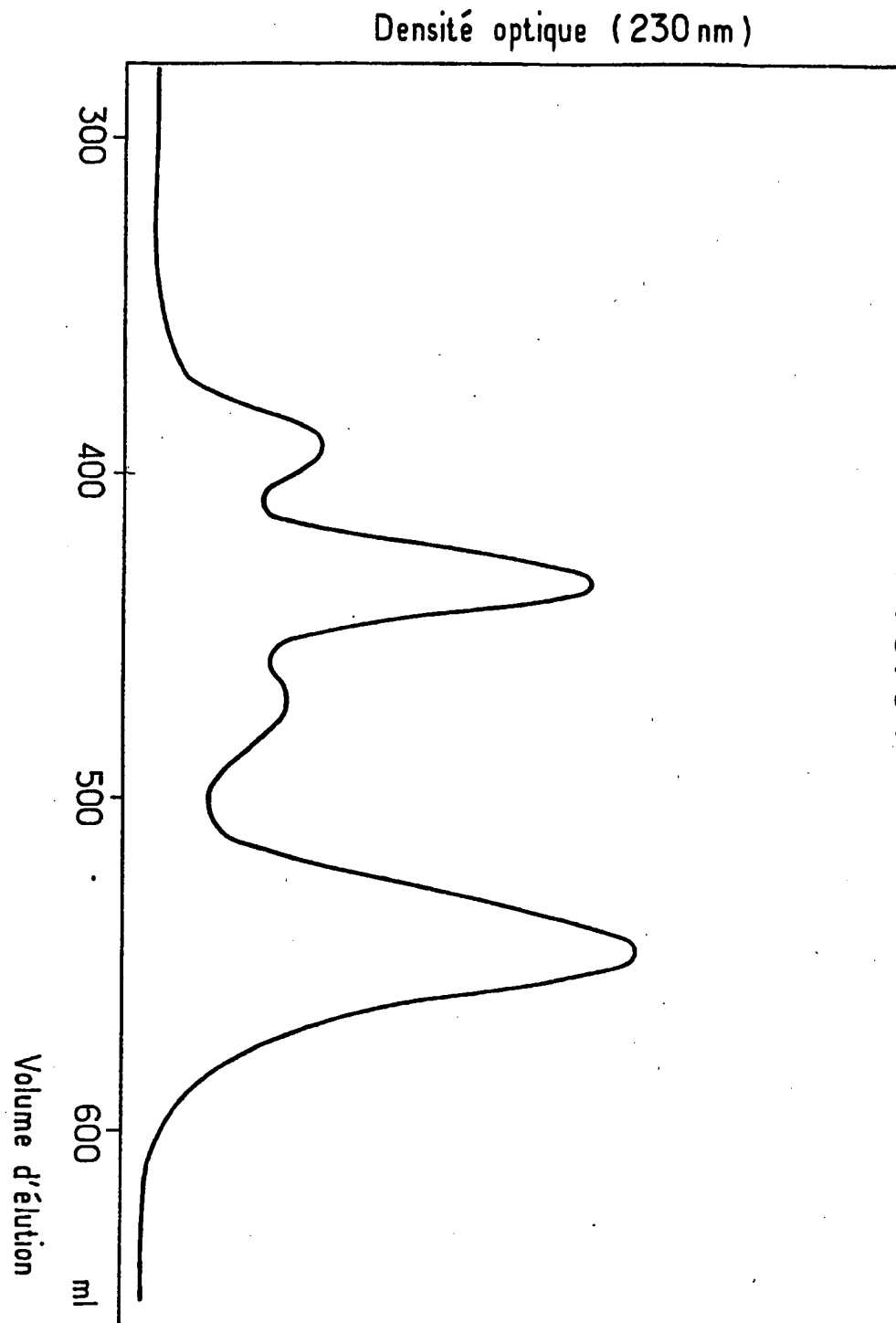
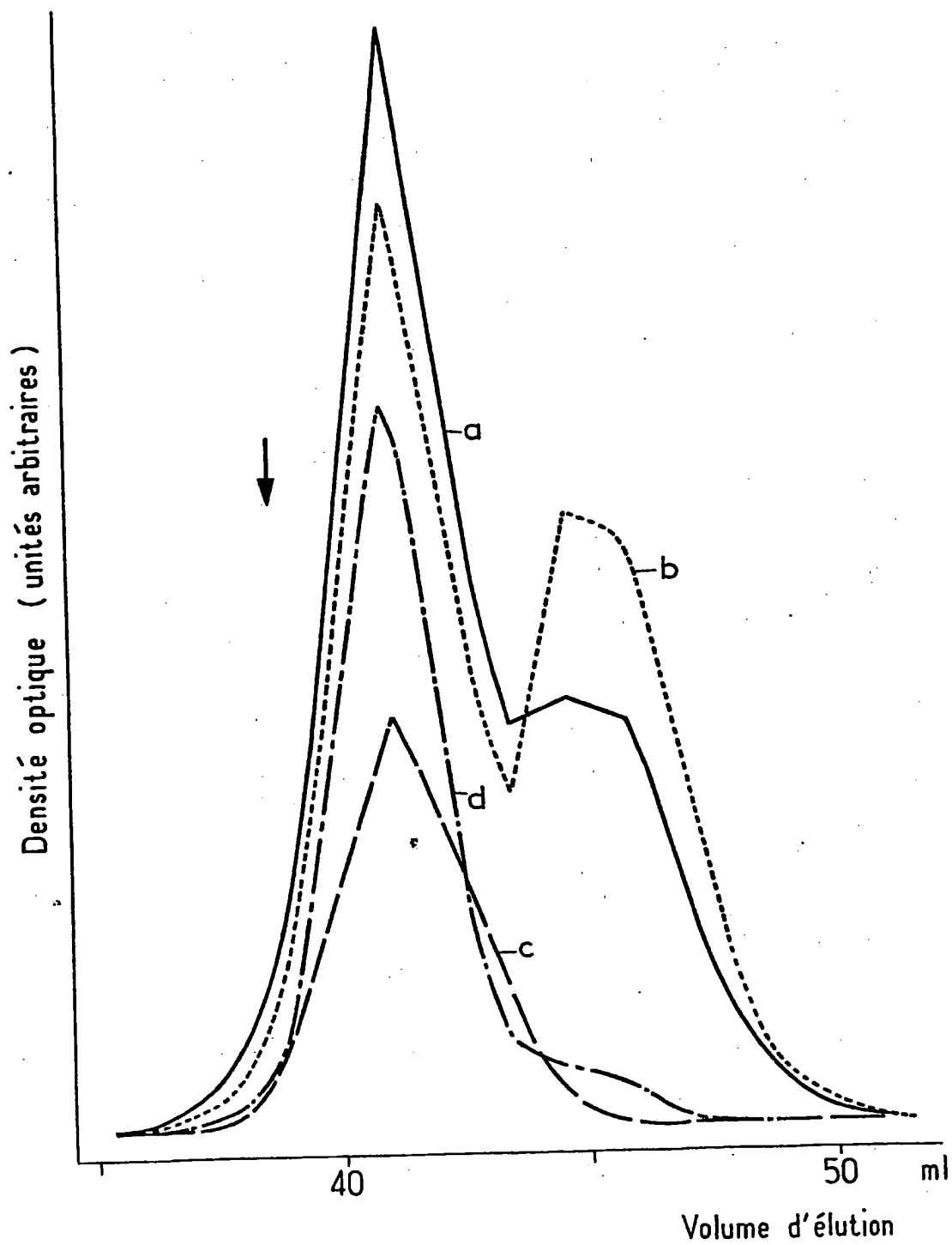


FIG. 3.

FIG. 4.





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0064452

Numéro de la demande

EP 82 40 0739

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 7)
Y	EP-1-0 027 089 (CHOAY) *Pages 34-36; exemples 4 et 5*	1-10	C 12 P 19/00 C 12 N 9/24 C 08 B 37/10
Y	----- BIOCHEMISTRY, vol. 11, no. 4, 1972, pages 563-568. A. LINKER et al.: "Isolation and Characterization of Oligosaccharides Obtained from Heparin by the Action of Heparinase" *Page 566, colonne de droite, premier alinéa* -----	1-10	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 7)
			C 12 N C 08 B A 01 J
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 06-08-1982	Examineur LENSSEN H.W.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.